

普罗布考对实验性大鼠急性痛风性关节炎的防治

罗 艳, 袁 鹰, 李长贵, 陈 红

(青岛大学医学院附属医院内分泌科, 山东省青岛市 266003)

[关键词] 内科学; 普罗布考; 痛风; 关节炎; 尿酸盐晶体; 人单核细胞株; 炎症介质

[摘要] 目的 探讨普罗布考防治痛风性关节炎的可行性及机制。方法 于大鼠单侧踝关节腔内注射尿酸钠晶体建立急性痛风性关节炎模型, 观察普罗布考干预后关节炎症、肿胀指数及关节液白细胞计数和白细胞介素 1 β 的变化。用尿酸盐晶体刺激人单核细胞, 普罗布考干预 18 h 后检测培养液中白细胞介素 1 β 的浓度。结果 普罗布考各剂量组关节炎症肿胀指数下降幅度由低剂量向高剂量依次增加, 与模型组比较, 72 h 时中高剂量组下降程度较明显 ($P < 0.05$), 关节液白细胞计数和白细胞介素 1 β 的含量均有不同程度的下降。普罗布考中高剂量组关节液白细胞计数较模型组下降明显 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 普罗布考高剂量组白细胞介素 1 β 较模型组下降明显 ($P < 0.05$)。普罗布考各剂量组对单核细胞分泌白细胞介素 1 β 无抑制作用。结论 中高剂量的普罗布考可以有效的控制大鼠急性痛风性关节炎的发作, 其疗效具有一定的剂量依赖性, 但其不是通过直接抑制单核细胞摄取尿酸盐晶体分泌白细胞介素 1 β 起作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Role of Probucol in Resolution of Monosodium Urate Monohydrate Crystal Induced Acute Gouty Arthritis of Rat

LUO Yan, YUAN Ying, LI Chang-Gui and CHEN Hong

(Department of Endocrinology, Medical School Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[KEY WORDS] Probucol; Gout; Arthritis; Monosodium Urate Monohydrate; The THP-1 Human Monocyte Cell Line; Inflammatory Mediators

[ABSTRACT] **Aim** To study the feasibility and mechanism of probucol in resolution of monosodium urate monohydrate (MSU) crystal-induced arthritis. **Methods** A rat model of acute gouty arthritis was induced with the injection of MSU into rat ankle joint cavity. The effects of probucol on arthritis were investigated through observing clinical features, the synovial fluid white blood cell count and interleukin-1 β (IL-1 β). IL-1 β concentration of culture medium was observed after the 18 h intervention with probucol in THP-1 monocytes while stimulated by MSU. **Results** The degree of joint swelling decreased gradually from probucol low-dose group to high-dose group and there was significant difference between mid-dose and high-dose probucol groups and model group at 72h ($P < 0.05$). The synovial fluid white blood cell count and IL-1 β declined in varying degrees in probucol groups compared with the model group. Synovial fluid white blood cell count of probucol mid-dose and high-dose group decreased significantly comparing with the model group ($P < 0.01$, $P < 0.001$). IL-1 β of probucol high-dose group decreased significantly comparing with the model group ($P < 0.05$).

Probucol group showed no inhibition on IL-1 β secretion of the THP-1 human monocyte cells. **Conclusion** The mid-dose and high-dose probucol can effectively control acute gouty arthritis attack and the effect is dependent on dose, but the effect is not produced by inhibiting IL-1 β secretion of THP-1 monocytes after the uptaking the MSU.

代谢综合征的发病率逐渐升高, 其中高尿酸血症和痛风的发病也增多。急性痛风性关节炎是痛风最常见的表现形式。国内外用于控制急性痛风性关节炎的药物主要有秋水仙碱、非甾体抗炎药和消炎痛等, 但由于这些药物的毒副作用较大而限制了痛

风的治疗。普罗布考作为一种具有抗氧化和抗炎特性的药物, 本文旨在通过建立大鼠急性痛风性关节炎模型, 应用普罗布考进行治疗, 并观察其疗效, 同时通过观察普罗布考对尿酸钠晶体 (monosodium urate monohydrate, MSU) 刺激人单核细胞 (the THP-1 human monocyte, THP-1) 分泌白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的影响探讨其可能的作用机制。

[收稿日期] 2008-09-23 [修回日期] 2008-10-25

[基金项目] 青岛市科技局重大项目 (06-2-2-3-nsh-1)

[作者简介] 罗 艳, 硕士研究生, 医师, 主要从事糖尿病代谢综合征等内分泌代谢疾病的研究, E-mail 为 ly8079@sohu.com。通讯作者袁鹰, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事糖尿病代谢综合征基础和临床研究, E-mail 为 yuanying@medmail.com.cn。李长贵, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事糖尿病、原发性高尿酸血症和痛风的遗传学研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

二级 Wistar 雄性大鼠, 体重 200 ± 10 g, 由青岛

市动物实验中心提供。人单核细胞株 THP-1 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。尿酸、秋水仙碱、吐温 80 均购于 Sigma 公司, 普罗布考由山东齐鲁制药厂提供。新生胎牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所生产, RPMI 1640 为 Gibco 公司产品。大鼠和人 IL-1 β 酶联免疫吸附反应检测试剂盒。

1.2 尿酸钠晶体制备

尿酸钠晶体的制备参考文献 [11] 的方法略作改进。实验前尿酸钠结晶 180℃ 3 h, 取 500 mg 尿酸钠结晶加 9 mL 生理盐水、1 mL 吐温 80 加热搅拌, 配制成 50 g/L 尿酸盐晶体溶液用于动物实验; 取 50 mg 尿酸钠结晶加 5 mL PBS 磷酸盐缓冲液, 配制成 10 g/L 的尿酸钠晶体溶液用于细胞实验。

1.3 急性痛风性关节炎大鼠模型的建立

麻醉大鼠后, 选右踝关节外侧后方为穿刺点, 针口斜面朝前上方与胫骨成 45° 夹角刺入踝关节腔, 以 45 号针头向关节腔一次性注入 50 g/L MSU 溶液 50 μ L, 以关节囊对侧膨起为注入标准。

1.4 动物分组和用药方法

将 60 只大鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱 [1 mg/(kg·d)] 组和普罗布考高、中、低剂量组 [普罗布考分别为 1000、500、250 mg/(kg·d)], 每组各 10 只。普通饲料喂养 1 周, 称取体重, 确定给药剂量, 于造模后 2 h 大鼠关节出现炎症反应时按上述剂量开始给药, 每日 2 次灌胃, 连续 3 d。

1.5 观察指标及评价方法

包括关节炎症指数、肿胀指数。(1) 炎症指数分级标准: 0 级, 正常; 1 级, 关节皮肤红斑, 轻度肿胀, 骨性标志可见; 2 级, 关节明显红肿, 骨性标志消失, 但肿胀局限于关节部位; 3 级, 关节以外肢体肿胀。炎症指数评分标准: 0 级 0 分, 1 级 2 分, 2 级 4 分, 3 级 6 分。(2) 肿胀指数定义: 通过 2~3 mm 宽纸条和游标卡尺测量实验前和诱导炎症后不同时间

的关节周径, 关节肿胀指数 = (测定时间点关节周径 - 初始周径) / 初始周径。

1.6 细胞培养与分组

THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 实验前更换为无血清的 1640 培养基培养 18 h, 细胞计数, 将细胞密度为 5×10^8 个/L 的 THP-1 接种于 24 孔板, 每孔 1 mL。除对照组外每孔加入 10 g/L MSU 溶液 10 μ L, 另普罗布考高、中、低剂量组按 160、80、40 μ mol/L 的浓度分别加入普罗布考, 秋水仙碱组加 5 μ mol/L 秋水仙碱, 模型组仅加入 MSU 溶液, 对照组仅加入 PBS 缓冲液。

1.7 标本的留取及检测指标

用 500 μ L 的无菌生理盐水冲洗大鼠关节腔, 留取两份, 一份于 6 h 内做白细胞计数, 一份 -70℃ 冰箱冻存以备检测关节液的 IL-1 β 的含量, IL-1 β 采用酶联免疫吸附法严格按照试剂说明书进行。细胞培养的各组培养 18 h 后留取细胞培养液 -70℃ 保存, 以备 IL-1 β 的检测。

1.8 统计学处理

数据用 SPSS 13.5 统计软件处理。各组均数间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 *q* 检验。

2 结果

2.1 各组治疗后大鼠关节炎症指数和肿胀指数的变化及比较

造模后各组大鼠关节炎症及肿胀度均有所增高, 10 h 后达高峰, 其中以模型组最为明显。在诱导关节炎 48 h 时普罗布考高剂量组关节炎症指数和肿胀指数均明显低于模型组 ($P < 0.05$), 在 72 h 时中、高剂量组炎症指数和肿胀指数均明显低于模型组 ($P < 0.05$, 表 1 和表 2)。

表 1 各组造模后不同时间炎症指数的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1.4 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.8	0.2 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
模型组	4.6 $\pm$ 0.8 ^a	4.8 $\pm$ 0.8 ^a	5.8 $\pm$ 0.4 ^a	6.0 $\pm$ 0.0 ^a	6.0 $\pm$ 0.0 ^a	5.8 $\pm$ 0.4 ^a	5.4 $\pm$ 0.5 ^a	4.4 $\pm$ 0.5 ^a
普罗布考高剂量组	4.5 $\pm$ 0.9 ^a	4.7 $\pm$ 0.8 ^a	5.5 $\pm$ 0.5 ^a	5.8 $\pm$ 0.4 ^a	5.8 $\pm$ 0.4 ^a	5.4 $\pm$ 0.8 ^a	4.6 $\pm$ 0.5 ^{ab}	3.0 $\pm$ 0.7 ^{ab}
普罗布考中剂量组	4.6 $\pm$ 0.5 ^a	4.8 $\pm$ 0.4 ^a	5.6 $\pm$ 0.5 ^a	6.0 $\pm$ 0.0 ^a	6.0 $\pm$ 0.0 ^a	5.8 $\pm$ 0.4 ^a	5.0 $\pm$ 0.7 ^a	3.7 $\pm$ 0.5 ^{ab}
普罗布考低剂量组	4.6 $\pm$ 0.8 ^a	4.8 $\pm$ 0.8 ^a	5.8 $\pm$ 0.4 ^a	6.0 $\pm$ 0.0 ^a	6.0 $\pm$ 0.0 ^a	5.8 $\pm$ 0.4 ^a	5.4 $\pm$ 0.8 ^a	4.2 $\pm$ 0.4 ^a
秋水仙碱组	4.0 $\pm$ 0.0 ^a	4.4 $\pm$ 0.5 ^a	5.6 $\pm$ 0.8 ^a	5.6 $\pm$ 0.5 ^{ab}	5.6 $\pm$ 0.5 ^{ab}	5.4 $\pm$ 0.5 ^{ab}	4.4 $\pm$ 0.8 ^{ab}	2.8 $\pm$ 0.8 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与模型组比较。

表 2 各组造模后不同时间肿胀指数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分 组	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.045 ± 0.034	0.076 ± 0.116	0.053 ± 0.022	0.051 ± 0.033	0.040 ± 0.019	0.028 ± 0.005	0.007 ± 0.004	0.003 ± 0.004
模型组	0.144 ± 0.021 ^a	0.225 ± 0.025 ^a	0.263 ± 0.027 ^a	0.308 ± 0.038 ^a	0.339 ± 0.052 ^a	0.302 ± 0.067 ^a	0.228 ± 0.050 ^a	0.193 ± 0.047 ^a
普罗布考高剂量组	0.144 ± 0.021 ^a	0.209 ± 0.031 ^a	0.249 ± 0.050 ^a	0.274 ± 0.049 ^a	0.331 ± 0.054 ^a	0.266 ± 0.049 ^a	0.183 ± 0.057 ^{ab}	0.139 ± 0.052 ^{ab}
普罗布考中剂量组	0.149 ± 0.021 ^a	0.219 ± 0.033 ^a	0.259 ± 0.046 ^a	0.289 ± 0.050 ^a	0.354 ± 0.063 ^a	0.275 ± 0.046 ^a	0.191 ± 0.054 ^a	0.142 ± 0.054 ^{ab}
普罗布考低剂量组	0.341 ± 0.051 ^a	0.226 ± 0.025 ^a	0.262 ± 0.026 ^a	0.308 ± 0.036 ^a	0.341 ± 0.051 ^a	0.301 ± 0.070 ^a	0.226 ± 0.054 ^a	0.194 ± 0.047 ^a
秋水仙碱组	0.291 ± 0.058 ^a	0.251 ± 0.050 ^a	0.224 ± 0.050 ^{ab}	0.253 ± 0.053 ^{ab}	0.291 ± 0.058 ^{ab}	0.251 ± 0.050 ^{ab}	0.19 ± 0.050 ^{ab}	0.137 ± 0.057 ^{ab}

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与模型组比较。

2.2 治疗后各组大鼠关节液白细胞计数比较

模型组、普罗布考各剂量组、秋水仙碱组大鼠关节液白细胞计数高于对照组,以模型组最为显著,普罗布考中剂量和高剂量组白细胞计数低于模型组 ($P < 0.01$,表 3)。

表 3 各组关节液白细胞计数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分 组	白细胞计数 ($\times 10^7/L$)
对照组	5.30 ± 1.74
模型组	14.18 ± 2.30 ^a
普罗布考高剂量组	7.43 ± 1.52 ^{ab}
普罗布考中剂量组	11.08 ± 1.64 ^{ac}
普罗布考低剂量组	12.85 ± 1.51 ^a
秋水仙碱组	6.15 ± 1.94 ^b

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b为 $P < 0.001$, c为 $P < 0.01$ 与模型组比较。

2.3 各组治疗后大鼠关节液白细胞介素 1 β 水平的比较

模型组和各用药组大鼠关节液 IL-1 β 高于对照组,以模型组最为显著,普罗布考高剂量组 IL-1 β 低于模型组 ($P < 0.05$),普罗布考中低剂量组与模型组比较有降低趋势,但无统计学意义(表 4)。

表 4 造模后 72 h 大鼠关节液白细胞介素 1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/关节}$)

分 组	白细胞介素-1 β
对照组	5.21 ± 1.05
模型组	19.87 ± 3.99 ^a
普罗布考高剂量组	15.41 ± 3.12 ^{ab}
普罗布考中剂量组	17.02 ± 4.61 ^a
普罗布考低剂量组	18.58 ± 4.38 ^a
秋水仙碱组	13.36 ± 1.96 ^{ac}

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b为 $P < 0.05$, c为 $P < 0.001$ 与模型组比较。

2.4 普罗布考对尿酸钠晶体刺激的单核细胞分泌白细胞介素 1 β 水平的影响

模型组、普罗布考各剂量组、秋水仙碱组培养液中 IL-1 β 水平均高于对照组,以模型组为最高,普罗布考各剂量组与模型组比较有降低趋势,但无统计学意义(表 5)。

表 5 干预培养 18 h 后各组细胞培养液中白细胞介素 1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{ng/L}$)

分 组	白细胞介素 1 β
对照组	17.45 ± 6.93
模型组	477.00 ± 62.62 ^a
普罗布考高剂量组	430.48 ± 75.54 ^a
普罗布考中剂量组	453.90 ± 69.97 ^a
普罗布考低剂量组	463.59 ± 71.74 ^a
秋水仙碱组	133.22 ± 47.18 ^{ab}

a为 $P < 0.001$ 与对照组比较; b为 $P < 0.001$ 与模型组比较。

3 讨 论

急性痛风性关节炎是尿酸钠晶体在关节及其周围沉积引起的急性炎症反应。MSU 沉积后激活炎症反应,产生血管活性物质,在炎症趋化因子作用下大量炎性细胞与血管内皮细胞粘附并浸润组织中,同时关节内也存在着氧化应激,有大量氧自由基如一氧化氮的生成及脂质过氧化代谢产物的产生均导致关节的损伤^[2],促使关节出现剧烈疼痛、红肿和功能障碍。关节炎 12 h 内达高峰,5~6 d 可自发缓解。局部浸润的细胞以中性粒细胞为主^[3]。IL-1 β 是前炎症网络中的一级细胞因子,作为炎症趋化因子和激活因子在痛风性关节炎的发生、发展过程中发挥关键作用^[4-5]。利用尿酸钠造模后关节出现红、肿、热、痛和功能障碍等急性痛风性关节炎的表现,关节肿胀 8~12 h 达到高峰,该动物模型较充分地模拟了人类急性痛风性关节炎的发病过程^[6]。本实验检测的关节液白细胞计数和 IL-1 β 含

量显示,尿酸钠刺激后,模型组白细胞计数和 IL-1 β 含量明显增高,提示由尿酸钠晶体成功诱导急性痛风性关节炎模型^[7,8]。在细胞实验中,秋水仙碱可抑制单核细胞 T 吞噬 MSU 后 IL-1 β 的分泌,与国外报道的结果一致,说明实验方法的可行性^[5]。

普罗布考为一种具有抗氧化和抗炎特性的药物。研究报道普罗布考能有效抑制微粒体膜脂质过氧化 DNA 损伤,降低脂质过氧化代谢产物及氧自由基的生成^[9];可以上调小鼠肝脏 PPAR γ 的表达^[10];同时能够通过减少组织巨噬细胞分泌白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 的表达,抑制粘附分子的表达^[11,12];减少细胞间粘附,改善内皮功能^[13]。普罗布考衍生物 AG I-1067 和 AG IX-4207 可显著抑制单核细胞和内皮细胞等细胞产生炎症因子,AG IX-4207 治疗类风湿性关节炎初步取得了较好的疗效,目前正处于进一步的临床试验阶段^[14,15]。

实验结果提示普罗布考抑制尿酸钠晶体引发的关节炎肿胀程度在实验 48 h 和 72 h 时抑制作用逐渐明显,实验模型诱发 48 h 后普罗布考疗效明显,即药物的显效时间与关节部位巨噬细胞开始出现的时间基本一致^[8],提示普罗布考的作用可能通过巨噬细胞实现,也可能通过上调 PPAR γ 蛋白表达促进炎症自发缓解起作用^[7]。实验显示关节液中普罗布考中、高剂量组白细胞数量下降明显,高剂量普罗布考组 IL-1 β 的含量下降明显,秋水仙碱可抑制单核细胞吞噬 MSU 后 IL-1 β 的分泌,但普罗布考各剂量组对 MSU 刺激后单核细胞分泌 IL-1 β 无抑制作用。说明普罗布考对急性痛风性关节炎局部 IL-1 β 的产生有一定的抑制作用,但对局部炎症反应的第一步单核细胞吞噬 MSU 分泌 IL-1 β 无直接抑制作用。其可能是通过抑制改善血管内皮功能、炎症细胞向炎症部位的迁移聚集及局部的氧化应激反应氧自由基的生成起作用,也可能对组织局部的滑膜细胞巨噬细胞分泌 IL-1 β 有抑制作用^[11-13]。普罗布考对 MSU 诱导炎症有明确的抑制作用,但较小剂量时作用并不明显,该剂量已相当于成人临床常用剂量,提示普罗布考的抗炎作用可能被过强的关节炎反应所掩盖。因此,深入研究普罗布考的抗炎作用机制,可为研发高效低毒抗炎新药提供思路。

总之,中剂量和高剂量普罗布考对 MSU 诱导的急性关节炎有明显抑制作用。但是,普罗布考能否

改善痛风患者整体病情及其安全性尚有待于进一步研究和临床观察,本实验为痛风性关节炎的治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint arthritis in rats provided useful tool for the evaluation of analgesic and antiarthritic agents [J]. *Pharm Biochem Behav*, 1988, **29** (3): 461-466
- [2] Jaramillo M, Naccache PH, Olivier M, et al. Monosodium urate crystals synergize with IFN- γ to generate macrophage nitric oxide involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and NF- κ B [J]. *Immunology*, 2004 **172** (9): 5734-742
- [3] Fujiwara K, Ohkawara S, Jakagi K, et al. Involvement of CXC chemokine growth-related oncogene- α in monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits [J]. *Lab Invest*, 2002 **82** (10): 1297-304
- [4] Chen CJ, Shi Y, Heam A, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals [J]. *J Clin Invest*, 2006, **116** (8): 2262-271
- [5] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006 **440**: 237-241
- [6] Huang HC, Sun YF, Hu M, et al. Characteristics of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute arthritis in rats that mimicked human gouty arthritis [J]. *Bull Acad Med Sci*, 2005 **29** (6): 538-542
- [7] Akahoshi T, Naito R, Murakami Y, et al. Rapid induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human monocytes by monosodium urate monohydrate crystals [J]. *Arthritis Rheum*, 2003 **48** (1): 231-239
- [8] Landis RC, Yagci DR, Florenc O, et al. Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages [J]. *Arthritis Rheum*, 2002 **46** (11): 3026-33
- [9] 叶延平,莫中成,龙治峰,等. 丙丁酚对动脉粥样硬化小鼠抗氧化作用的比较 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (7): 513-518
- [10] 尹小波,莫中成,叶延平,等. 丙丁酚可干预小鼠动脉粥样硬化病变并调节 B 类 I 型清道夫受体的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (7): 569-570
- [11] Ku G, Doherty NS, Schmidt LF, et al. Ex vivo lipopolysaccharide-induced interleukin-1 secretion from murine peritoneal macrophages inhibited by probucol: a hypocholesterolemic agent with antioxidant properties [J]. *FASEB J*, 1990 **4** (6): 1645-653
- [12] Niman-Jonsson A, Dinayaga P, Jovinge S, et al. Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor- α expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000 **20** (10): 2205-211
- [13] Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Markiewski M, et al. Selective inhibition by probucol of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human vascular endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2001, **155** (1): 123-130
- [14] Kunsch C, Luchoomun J, Janice Y, et al. Selective inhibition of endothelial and monocyte redox-sensitive genes by AG I-1067: A novel antioxidant and anti-inflammatory agent [J]. *J Pharm Exp Therap*, 2004 **308** (3): 820-829
- [15] Kunsch C, Luchoomun J, Chen XL, et al. AG IX-4207, a novel antioxidant and anti-inflammatory compound: cellular and biochemical characterization of antioxidant activity and inhibition of redox-sensitive inflammatory gene expression [J]. *J Pharm Exp Therap*, 2005 **313** (2): 492-501

(此文编辑 李玲玲)